

-1-

PARTIAL TRANSLATION OF JAPANESE PATENT NO. 2884045

①

(57) [Claims]

[Claim 1]

5       A carbonic acid- and/or bicarbonate-iron-lactoferrin complex exhibiting the following characteristics:

1) Contains from 15 to 1,000 molecules of iron and 15 or more molecules of a carbonic acid and/or a bicarbonate per molecule of a lactoferrin;

10       2) Does not precipitate at a pH of not less than 2.1 and not more than 9.0 for at least a month at room temperature;

3) Does not precipitate upon heating; and

4) Does not have the astringent taste that is peculiar to iron.

15

... Translation Omitted ...

[Industrial Availability]

20

... Translation Omitted ...

②

In the carbonic acid- and/or bicarbonate-iron-lactoferrin complex of the present invention, the astringency that is peculiar to iron is masked,  
25 and the peroxide-formation promoting function of iron is

prevented. The complex is therefore useful as an ingredient of foods, pharmaceutical products, livestock feeds, cosmetics and the like for preventing or treating anemia, or fortifying iron or preventing the adhesion of pathogenic bacteria.

5 [0002]

[Prior Art]

Lactoferrin (hereinafter abbreviated to Lf) has a variety of known physiological functions, such as promoting iron absorption, suppressing the formation of lipid peroxides,  
10 an antibacterial function, an antiviral function, a cell growing function, and a controlling function for the immune system.

... Translation Omitted ...

③ 15 [0070]

[Example 9]

A concentrated and desalted iron-Lf complex solution prepared as in Example 4 (test group) and a ferrous sulfate solution (control group 1) were each dissolved in a  
20 physiological phosphate buffer (pH 7.2) which contains 6.2 mg/100 g of ascorbic acid and sodium ascorbate as vitamin C, so as to provide an iron concentration of 20 mg/100 ml. The resulting solutions were sterilized at 90 °C for 10 minutes, and were used as test samples. A test sample for control group  
25 2 was also prepared by sterilizing a physiological phosphate

buffer containing vitamin C. From a group of Wister female rats (CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN) which were 21 days old and had just been weaned, rats weighing from 45 to 50 grams were chosen. These rats were fed an iron-free feed (by  
5 Oriental Yeast Co., Ltd.; iron content: 0.25-mg/100-g feed) for 2 weeks to induce anemia in the rats so that the blood hemoglobin value was 7 g/100 ml or less. Thereafter, each group consisting of four rats continued to be fed the iron-free feed. In the meantime, they were forcibly administered  
10 (orally through probes) their test sample in an amount of 1 ml/day for 6 weeks. At 6 weeks after the test sample administration, blood was collected from the tail vein, and hemoglobin values were measured by automatic hematology measuring equipment (SYSMEX CORPORATION).

15 The results are shown in Table 18.

[0071]

[Table 18]

Hemoglobin value (mean value ± standard deviation)	
Test group	15.2 ± 1.1 (g/100 ml)
Control group 1	12.9 ± 0.9
Control group 2	4.8 ± 0.3

[0072]

20 The results shown above reveal that the iron-Lf complex

-4-

of the present invention exhibits an effect for anemia treatment, which is superior to that provided by ferrous sulfate, i.e., inorganic iron.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2884045号

(45) 発行日 平成11年(1999) 4月19日

(24) 登録日 平成11年(1999) 2月12日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K 14/79		C 0 7 K 14/79	
// A 6 1 K 33/26		A 6 1 K 33/26	
38/16	A C C	37/14	A C C
	A D Z		A D Z
C 0 7 K 103:00			
請求項の数 6 (全 17 頁)			

(21) 出願番号	特願平7-86023	(73) 特許権者	000006699 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号
(22) 出願日	平成7年(1995) 3月17日	(72) 発明者	桜井 稔夫 埼玉県所沢市喜多町12-12-1-301
(65) 公開番号	特開平7-304798	(72) 発明者	小林 直道 埼玉県川越市新宿町5-11-3
(43) 公開日	平成7年(1995) 11月21日	(72) 発明者	内田 俊昭 埼玉県川越市新宿町5-11-3
審査請求日	平成9年(1997) 9月8日	(72) 発明者	堂迫 俊一 埼玉県浦和市北浦和5-15-39-616
(31) 優先権主張番号	特願平6-74262	(74) 代理人	弁理士 藤野 清也
(32) 優先日	平6(1994) 3月18日		
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	審査官	高堀 栄二
		(56) 参考文献	特開 平6-239900 (J P, A)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 鉄-ラクトフェリン複合体及びその製造法

## (57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の性質を示す炭酸および／または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体。

- 1) ラクトフェリン類1分子当り、鉄を15乃至1000分子および、炭酸および／または重炭酸15分子以上を含有すること、
- 2) pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈澱を生じないこと、
- 3) 加熱しても沈澱を生じないこと、
- 4) 鉄独特の収斂味がないこと。

【請求項2】 鉄-ラクトフェリン複合体に結合している炭素原子および鉄原子について、( (請求項1記載の鉄-ラクトフェリン複合体1モルあたりの総炭素原子モル数) - (鉄を結合していないラクトフェリン1モルあたりの総炭素原子モル数) ) / (請求項1記載の鉄-ラ

クトフェリン複合体1モルあたりの総鉄原子モル数) の値が 0.1以上である請求項1記載の複合体。

【請求項3】 i) 炭酸、またはii) 重炭酸、またはiii) 炭酸および重炭酸を含む溶液 (A溶液) に、iv) 鉄およびv) ラクトフェリン類を含有する溶液 (B溶液) を混合することによって得られ、次の1) から4) の性質を示す炭酸および／または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体。ただし、このときB溶液のvi) 鉄イオンモル濃度は、vii) A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液 (反応溶液) に溶解しているviii) 炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の 1/3以下であって、B溶液のix) ラクトフェリン類のモル濃度は、B溶液のx) 鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である。

1) ラクトフェリン類1分子当り、鉄を15乃至1000分子、かつ炭酸および／または重炭酸15分子以上含有する

3

こと、

2) pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈澱を生じないこと、

3) 加熱しても沈澱を生じないこと、

4) 鉄独特の収斂味がないこと。

【請求項4】 i)炭酸、またはii)重炭酸、またはiii)炭酸および重炭酸、かつiv)ラクトフェリン類を含む溶液(A溶液)に、v)鉄を含有する溶液(B溶液)を混合することによって得られ、次の1)から4)の性質を示す炭酸および/または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合

10

体。ただし、このときB溶液のvi)鉄イオンモル濃度は、vii)A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液(反応溶液)に溶解しているviii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の1/3以下であって、ix)A溶液のラクトフェリン類のモル濃度は、B溶液のx)鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である。

1)ラクトフェリン類1分子当り、鉄を15乃至1000分子、かつ炭酸および/または重炭酸15分子以上含有すること、

2) pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈澱を生じないこと、

3) 加熱しても沈澱を生じないこと、

4) 鉄独特の収斂味がないこと。

【請求項5】 i)炭酸、またはii)重炭酸、またはiii)炭酸および重炭酸を含む溶液(A溶液)に、iv)鉄およびv)ラクトフェリン類を含有する溶液(B溶液)を混合することを特徴とする、次の1)から4)の性質を示す炭酸および/または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体の製造法。ただし、このときB溶液のvi)鉄イオンモル濃度は、vii)A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液(反応溶液)に溶解しているviii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の1/3以下であって、B溶液のix)ラクトフェリン類のモル濃度は、B溶液のx)鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である。

20

1)ラクトフェリン類1分子当り、鉄15乃至1000分子、かつ炭酸および/または重炭酸15分子以上を含有すること、

2) pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈澱が生じないこと、

3) 加熱しても沈澱を生じないこと、

4) 鉄独特の収斂味がないこと。

【請求項6】 i)炭酸、またはii)重炭酸、またはiii)炭酸および重炭酸、かつiv)ラクトフェリン類を含む溶液(A溶液)に、v)鉄を含有する溶液(B溶液)を混合することを特徴とする、次の1)から4)の性質を示す炭酸および/または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体の製造法。ただし、このときB溶液のvi)鉄イオンモル濃度は、vii)A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液(反応溶液)に溶解しているviii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の1/3以下であって、A

30

40

50

4

溶液のix)ラクトフェリン類のモル濃度は、B溶液のx)鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である。

1)ラクトフェリン類1分子当り、鉄を15乃至1000分子、かつ炭酸および/または重炭酸15分子以上含有すること、

2) pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈澱を生じないこと、

3) 加熱しても沈澱を生じないこと、

4) 鉄独特の収斂味がないこと。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、広いpH域に対して安定であり、かつ耐熱性を示す炭酸および/または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体及びその製造法に関する。本発明の炭酸および/または重炭酸-鉄-ラクトフェリン複合体は、鉄独特の収斂味を消し、鉄の持つ過酸化物生成促進作用を防止するので、貧血の予防あるいは治療、鉄強化あるいは病原菌付着防止を目的とした食品、医薬品、飼料、化粧品原料等として有用である。

【0002】

【従来の技術】ラクトフェリン(以下、Lfという)には鉄吸収促進、過酸化脂質生成抑制、抗菌、抗ウィルス、細胞増殖、免疫系の制御など様々な生理機能が知られている。そこでLfを含有する食品、医薬品、飼料、化粧品などを製造する試みが色々とされている。このような製品の多くは加熱殺菌されたり、使用時に熱湯と接触する場合がある。しかしながら、Lfは熱に不安定であり、熱変性すると沈澱したり、鉄結合能を失いその生理機能も失われてしまうという致命的な欠点があった。そこで、Lfの熱安定化に関する検討が行われ、pH4にて加熱したLfは生のLfと同等に鉄を結合する能力を有することが報告された(Davidson and Lonnerdal, Am. J. Physiol. 257:G930-G934, 1989)。しかし、このようにして調製されたLfは保存中に次第に変性し、その生理機能を失うという欠点があった。また、イオン強度の低い条件でLfを加熱すると生理活性を維持し得ることが知られている(特開平4-108629号公報)。しかし、実際の製品の系ではイオン強度は必ずしも低くない。そこでpHと電気伝導度 $\Omega$ の関係が、Lfの熱安定性におよぼす影響が検討され、

$\log \Omega \leq (2.96/\text{pH}) + 0.64 \quad (\text{pH} < 5)$

$\log \Omega \leq (29.37/\text{pH}) - 4.62 \quad (5 \leq \text{pH} \leq 7.9)$

$\log \Omega \leq -0.917 \quad (\text{pH} > 7.9)$

となるようにLf含有溶液を調整することによってLfの熱安定化を図る方法が開発された(特開平4-8269号公報)。しかし、この条件を満たさない場合には、この条件に調整したLf溶液と他の原料溶液を別々に殺菌し、無菌的に両者を混合するという手段をとる必要がある。ところが「乳および乳製品等に関する厚生省令」によれば、全ての原料を混合後加熱殺菌することが定められて

②

おり、別々に殺菌することは実用的ではなかった。そこで本発明者らはさらに検討を重ねた結果、L f に鉄を十分量結合吸着させることで、耐熱性を賦与させることが可能となることを発見し、その製造方法について特許出願を行った（耐熱性ラクトフェリン-鉄結合体およびその製法 特開平6-239900号）。しかし、この発明においても、次のような欠点を有していた。

1. 製造されたL f はpH 7.1以上の環境下では沈殿する。

2. 製造されたL f はpH 6.5以上であってpH 7以下の環境下では可溶であり耐熱性もあるものの、L f に結合している鉄が、L f 1分子あたり 150分子を越える場合には製造後、pH 6.5以上であってpH 7以下の環境下に保存しておくとき徐々に不溶化する。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、このような欠点を改善することを目的としてなされたものである。すなわち、本発明は、広いpH範囲で長期間安定で、耐熱性も有する鉄-L f 複合体およびその製造方法を提供することを課題とする。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討したところ、

1)炭酸イオンまたは重炭酸イオンを含有する溶液にL f 類および鉄イオンを含有する溶液を加えて混合すると炭酸または重炭酸-鉄-L f 複合体が形成されること、2)この複合体は、炭酸イオンまたは重炭酸イオンを含有する溶液に、炭酸イオンまたは重炭酸イオンに対して特定の比率のL f 類および鉄を含有する溶液を加えるという手段をとることによって初めて形成され、得られる鉄を高い比率で含有する複合体が広いpH範囲で長期間に亘り安定で、しかも耐熱性を有し、さらに鉄独特の収斂味を消し、鉄の持つ過酸化化物生成促進作用を防止することを見出して本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、L f 類1分子当り、鉄を15乃至1000分子、かつ炭酸および/または重炭酸を15分子以上含有する、炭酸イオンおよび/または重炭酸イオン-鉄-L f 複合体（以下、鉄-L f 複合体と略記する）に関する。このような鉄-L f 複合体は、pH 2.1以上 9.0以下で常温で少なくとも1ヶ月間沈殿を生じず、また加熱しても沈殿を生じず、鉄独特の収斂味がないという性質を示す。

【0005】そしてこのような複合体は、i)炭酸、またはii)重炭酸、またはiii)炭酸および重炭酸を含む溶液（A溶液）と、iv)鉄およびv)ラクトフェリン類を含有する溶液（B溶液）を混合することによって得られ、このときB溶液のvi)鉄イオンモル濃度は、vii)A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液（反応溶液）に溶解しているviii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の1/3以下、好ましくは1/10、より好ましくは1/30、さらには1/60、最も好ましくは1/100であ

って、B溶液のix)ラクトフェリン類のモルの濃度は、B溶液のx)鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である必要がある。B溶液の鉄とラクトフェリン類はそれぞれ別々に溶解した溶液をA溶液に混合して作成してもよいし、A溶液に別々に混合しても構わない。ただし、鉄溶液をラクトフェリン類溶液より先に添加してはならない。また、反応は溶液内で行われる必要があるが、添加する鉄またはラクトフェリン類のいずれか一方が固体状であっても構わない。さらに、反応溶液中の炭酸イオンおよび重炭酸イオンモル濃度を高く保つために、あらかじめ、溶解しきれない量の炭酸および/または重炭酸塩をA溶液に含有させておいてもよいし、A溶液にB溶液を添加している途中、つまり、B溶液の一部がA溶液に添加されている段階の反応溶液にi)炭酸および/または重炭酸塩、および/またはii)炭酸および/または重炭酸溶液を添加してもよい。

【0006】また、A溶液にB溶液を添加する際には、A溶液の炭酸および/または重炭酸塩、および/または炭酸および/または重炭酸溶液のpHが徐々に減少する。この際に、ごくたまに、製造中に沈殿を生じることがある。B溶液のpHは8から9の間にあり、また、L f の等電点と同じくpH 8から9であること（E.N. ペーカー、アドバンスト オーガニック ケミストリー 41,390）から、この現象はL f および/または鉄-L f 複合体が等電点沈殿をおこしている可能性がある。これを避けるためには、AおよびB溶液の混合溶液のpHをL f の等電点より高い値で保つか、AおよびB溶液の混合液のpHがL f および/または鉄-L f 複合体の等電点より高いpHで製造を終了させるか、B溶液のpHをL f の等電点以下に調整してから、あるいは混合液のpHをB溶液添加中に随時、等電点以下に調整することが好ましい。このようにすると、L f および/または鉄-L f 複合体の等電点沈殿と思われる沈殿がおさえられ、特に工業規模で行う生産の場合にはより確実に安定的に鉄-L f 複合体を製造することができる。

【0007】また、本発明の鉄-L f 複合体は、i)炭酸、またはii)重炭酸、またはiii)炭酸および重炭酸、かつiv)ラクトフェリン類を含む溶液（A溶液）と、v)鉄を含有する溶液（B溶液）を混合することによっても得られ、このときB溶液のvi)鉄イオンモル濃度は、vii)A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液（反応溶液）に溶解しているviii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンのモル濃度の1/3以下、好ましくは1/10、さらに好ましくは1/30、さらには1/60、最も好ましくは1/100以下であって、A溶液のix)ラクトフェリン類のモルの濃度は、B溶液のx)鉄イオンモル濃度の1/15から1/1000である必要がある。この製法においても、等電点付近で極くまれに起こる沈殿を防止するため、前記した方法を使用することが好ましい。

【0008】本発明において使用するL f 類にはヒトや

ウシなどの哺乳類の乳などの分泌液から分離されるラク  
トフェリン、または血液や臓器などから分離されるトラ  
ンスフェリン、卵などから分離されるオボトランスフェ  
リンなどがある。これらはすでに大量に分離する方法が  
いくつも知られているが、どのような方法で分離され  
たものであってもよい。また、遺伝子操作によって微生  
物、動物細胞あるいはトランスジェニック動物から生産  
されたものであってもよい。また、これら L f 類は酵素  
分解したものであってもよい。L f 類は完全に分離され  
ている必要はなく、他の成分が含まれていても構わな  
い。

【0009】添加する鉄の量は L f 1 モルに対して鉄イ  
オンとして15モル以上、より好ましくは30モル以上、さ  
らに好ましくは60モル以上であり、上限は1000モル以  
下、好ましくは 480モル以下である。製造に要する時間  
を短くするため又は、収率を落とさないためには 240モ  
ル以下が好ましい。加える鉄量が前記の上限を越えると  
鉄が沈澱してくる。使用する鉄剤は、脱イオン水に溶解  
した時のpHが4以下を示す鉄塩、例えば塩化第2鉄、硝  
酸第2鉄、硫酸第2鉄など、主に3価の鉄剤を例示でき  
る。脱イオン水に溶解した時のpHが4を越える鉄塩、例  
えば硫酸第1鉄などでは鉄-L f 複合体を形成すること\*

\* ができない。また、この時にpHを4以下に下げても鉄-L f 複合体を形成することはできない。

【0010】次に鉄剤の種類による熱安定性の違いを試  
験例にて示す。

#### 【試験例1】

(材料)

(A溶液) 1モル/リットルの重炭酸ナトリウムを含む  
pH 8.3の溶液 1リットル

(B1溶液) 各種鉄剤を鉄として5ミリモル含む溶液  
0.2リットル

(B2溶液) L f (オレオフィナ社製) 33マイクロモル  
を含む溶液 0.8リットル

B1溶液とB2溶液を混合後(B溶液)、A溶液にB溶  
液を加え、鉄を結合したL f を作成した。この溶液を分  
子量5000カットの限外濾過膜で脱塩・濃縮後、最終濃度  
0.05モル/リットルのイミダゾール、0.15モル/リット  
ルの食塩を含むpH 7.5の液状食品を模倣した緩衝液(模  
擬緩衝液)で3.6ミリモル/リットルの鉄濃度となるま  
で希釈し、90℃10分間加熱し、L f の沈澱の生成を観察  
した。その結果を表1に示す。

#### 【0011】

【表1】

鉄 剤	鉄として 120 $\mu$ g/mlを脱イオン水に 溶解した時のpH	沈澱の有無
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	2.7	無 し
FeSO <sub>4</sub>	4.8	有 り
FeCl <sub>3</sub>	2.7	無 し
FeCl <sub>2</sub>	4.6	有 り
Fe(SO <sub>4</sub> )NH <sub>4</sub>	4.8	有 り
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.6	無 し
ピロリン酸鉄	6.8	有 り
クエン酸鉄	6.5	有 り
フマル酸鉄	4.5	有 り
FeSO <sub>4</sub>	4.8 → 2.7 (塩酸でpHを下げた)	有 り

このように、脱イオン水に溶解した時のpHが4以下の鉄  
剤を使用しないと本発明の鉄-L f 複合体は形成できな  
い。また、脱イオン水に溶解した時のpHが4を越える場  
合に、そのpHを4以下に調整しても本発明の鉄-L f 複  
合体は形成できない。

【0012】炭酸または重炭酸を含むA溶液としては、  
炭酸水、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭  
酸カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム溶液およ  
びそれらの混合溶液などを例示することが出来る。これ  
らにpH調整剤として水酸化ナトリウム、アンモニア、水  
酸化カリウム、塩酸、クエン酸、乳酸などを混合して使  
用することができる。また、このA溶液には、それ以外  
の物質、例えば、糖、蛋白質、脂肪などが含まれていて

も構わない。

【0013】しかし、重要なことは反応時の鉄イオン濃  
度と、炭酸イオンおよび重炭酸イオン濃度の比が、鉄-L f 複合体の熱安定性に影響を及ぼす点である。このこ  
とに関する試験例を示す。

#### 【試験例2】

(材料)

(A溶液) 各濃度の重炭酸ナトリウムを含む溶液 1リッ  
トル

(B1溶液) 塩化第二鉄を含む溶液 0.2リットル

(B2溶液) L f 1ミリモルを含む溶液 0.8リットル

B1溶液とB2溶液を混合して溶液Bを作成し、A溶液  
にB溶液を1リットル加えて鉄を結合したL f を作成し



た。なお、B溶液は脱イオン水で希釈したものを用いた。最終重炭酸イオンモル濃度を 0.6以上とする場合にはA溶液とB溶液混合時に重炭酸ナトリウムを添加するか、あらかじめA溶液に必要な量の重炭酸ナトリウムを添加し、飽和の溶液とした。この溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて加水脱塩し、さらに濃縮した。そして、模擬緩衝液で 3.6ミリモル／リットルの鉄濃度とな\*

\* るまで希釈し、90℃10分間加熱し、Lfの沈澱生成を観察した。その結果を表2に示す。なお、表の最小重炭酸イオン鉄イオン比は、A溶液とB溶液混合後の重炭酸イオンモル濃度を、B溶液の鉄イオンモル濃度で除して算出した。

【0014】

【表2】

B1溶液に30ミリモルの鉄が含まれている場合

重炭酸イオンモル濃度		沈澱の有無	最小 重炭酸イオン／鉄イオン比 (モル濃度／モル濃度)
A溶液	A B混合後		
1.0	0.5	無 し	16.67
0.8	0.4	無 し	13.33
0.6	0.3	無 し	10.00
0.4	0.2	やや有り	6.67
0.2	0.1	やや有り	3.33
0.1	0.05	有 り	1.67

【0015】

※ ※【表3】

B1溶液に 200ミリモルの鉄が含まれている場合であって、B溶液を20倍希釈した場合（B溶液中に10ミリモル／リットルの鉄が含まれる）

重炭酸イオンモル濃度		沈澱の有無	最小 重炭酸イオン／鉄イオン比 (モル濃度／モル濃度)
A溶液	A B混合後		
飽 和	飽 和	無 し	1 2 0 以上
飽 和	1.2	無 し	1 2 0
飽 和	1.0	無 し	1 0 0
飽 和	0.8	ごくわずかに有り	8 0
飽 和	0.7	ごくわずかに有り	7 0
1.2	0.6	ごくわずかに有り	6 0
1.0	0.5	やや有り	5 0
0.6	0.3	やや有り	3 0
0.3	0.15	有 り	1 5

【0016】以上のように、B溶液の鉄濃度を高めるにつれて、AB混合溶液の重炭酸イオン濃度を高める必要がある。このように、本発明の鉄-Lf複合体の調製にあたっては、A溶液にB溶液を添加して行く過程において、添加した鉄1分子の周囲には少なくとも3分子、好ましくは10分子以上の炭酸および／または重炭酸分子が常に存在している必要がある。さらにいえば、Lf1分子に 200分子を越える量の鉄分子を結合させる場合には、鉄1分子の周囲には30分子以上、好ましくは60分子以上、より好ましくは 100分子以上の炭酸イオンおよび／または重炭酸イオン分子が存在しているとよい。

【0017】次に、本発明の鉄-Lf複合体には、どの

40 くらいの炭酸および／または重炭酸が結合しているかについて次の検討を行った。

【試験例3】

(材料)

(A溶液) 各濃度の重炭酸ナトリウムを含む溶液 1 リットル

(B1溶液) 塩化第二鉄 100ミリモルを含む溶液 0.2リットル

(B2溶液) Lf1ミリモルを含む溶液 0.8リットル

B1溶液とB2溶液を混合後（B溶液）、A溶液にB溶液を加え、4℃および37℃にて各反応時間、ゆっくり攪拌して鉄を結合したLfを調製した。この溶液を模擬緩

衝液で 3.6ミリモル／リットルの鉄濃度となるまで希釈し、90℃、10分間加熱し、L f の沈澱生成を観察した。さらに、192時間反応後の溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて鉄を結合したL f と水溶液を分離し、膜を透過した溶液中の炭酸イオンおよび重炭酸イオン濃度を＊

＊イオンクロマト法により分析した。その結果を表 4 及び表 5 に示す。

【0018】

【表 4】

反応温度 4℃の場合								
重炭酸イオン モル濃度		最小重炭酸 イオン／ 鉄イオン比 (モル濃度 ／モル濃度)	沈 澱 の 有 無					濾過膜透過 液中の重炭 酸イオン濃 度 (ミリモ ル／リット ル)
A溶液	AB 混合後		反 応 時 間					
			2	24	48	96	192	
1.2	0.6	6	無し	無し	無し	無し	無し	0.4654
0.8	0.4	4	無し	無し	無し	無し	無し	0.2630
0.4	0.2	2	有り	無し	無し	無し	無し	0.0988
0.2	0.1	1	有り	有り	有り	無し	無し	0.0005
0.1	0.05	0.5	有り	有り	有り	有り	有り	0.0007
0.05	0.025	0.25	有り	有り	有り	有り	有り	0.0004

【0019】

※ ※ 【表 5】

反応温度37℃の場合

重炭酸イオン モル濃度		最小重炭酸 イオン／ 鉄イオン比 (モル濃度 ／モル濃度)	沈 澱 の 有 無				
A 溶液	AB 混合後		反 応 時 間				
			2	24	48	96	192
1.2	0.8	6	無し	無し	無し	無し	無し
0.8	0.4	4	無し	無し	無し	無し	無し
0.4	0.2	2	有り	有り	有り	有り	有り
0.2	0.1	1	有り	有り	有り	有り	有り
0.1	0.05	0.5	有り	有り	有り	有り	有り
0.05	0.025	0.25	有り	有り	有り	有り	有り

【0020】 以上のように、低温下で長時間反応させると炭酸イオンおよび重炭酸イオン／鉄イオン比が1であっても本発明の鉄-L f 複合体を形成できる。しかし、これ以上の低濃度であると長時間反応させても製造できない。さらに 192時間反応後の限外濾過膜透過液中の炭酸イオンおよび重炭酸イオン濃度が、最小重炭酸イオン／鉄イオン比が1以下の場合、脱イオン水の濃度と同じであることより、A溶液中の重炭酸は全て鉄-L f 複合体と結合したものと考えられる。また、37℃で反応させた場合には、炭酸イオンおよび重炭酸イオン／鉄イオン比が2以下では本発明の鉄-L f 複合体は形成できない。

【0021】 この結果から、本発明の鉄-L f 複合体には炭酸および／または重炭酸イオンが結合鉄あたり1分子以上含有しているものと考えられる。さらにこの鉄-L f 複合体形成の反応速度を上げるためには炭酸イオンおよび／または重炭酸イオン濃度を高めることが効果的であることも明らかとなった。また、この例から、B溶液のi)鉄イオンモル濃度が、ii) A溶液と、B溶液の一部または全部が混合した溶液（反応溶液）のiii)炭酸イオンおよび重炭酸イオンモル濃度と同等であっても、鉄-L f 複合体を形成可能であることが明らかとなった。しかしながら、この条件では、製造に極端に時間を要するため、実用的ではない。

## 【0022】

【試験例4】さらに元素分析により鉄原子および炭素原子のモル数を分析し、本発明の鉄-Lf複合体の特徴を示す。モノクローナル抗体により精製した純度99%のウシLf（東洋紡績社）はLf溶液を0.1%エチレンジアミン四酢酸を含む0.1モル/リットルクエン酸溶液（超純水）に対して分子量10000カットの透析膜（スペクトロポア社）で3日間透析し、脱鉄し、超純水に対してさらに4日間透析を行い、完全に鉄を除去し、さらに凍結乾燥を行った。1モル/リットルの重炭酸ナトリウムを含むpH 8.3の溶液10ミリリットル（A溶液）、塩化第二鉄を300マイクロモル含む溶液を2ミリリットル（B1溶液）、Lf 2.5マイクロモルを含む溶液8ミリリットル（B2溶液）を調製した。B1溶液にB2溶液を混合し\*

\*（B溶液）、A溶液にB溶液10ミリリットルを加え、鉄-Lf複合体を調製し、試料1とした。同様に、B1溶液の塩化第二鉄を1.75ミリモルとして作製した鉄-Lf複合体を試料2とした。また、脱鉄した未処理のLfを試料3とし、試料1、2および3は超純水に対して、5日間分子量10000カットの透析膜（スペクトロポア社）で透析し、凍結乾燥した。さらに、メノウ乳鉢で良く粉化した後、45℃、48時間真空乾燥機により、水分を除去した。得られた試料は原子吸光分析機（ICP）により鉄含有量、CHN元素分析機により炭素含有量を分析した。

## 【0023】

## 【表6】

試料	$\Delta C^{1)}$ (モル)	$Fe^{2)}$ (モル)	$\Delta C/Fe$ (モル)
1	60	117	0.5
2	71	706	0.1

<sup>1)</sup>（試料1モルあたりの総炭素原子モル数）-（Lf（試料3）1モルあたりの総炭素原子モル数）

<sup>2)</sup> 試料の総鉄原子モル数

【0024】以上の元素分析の結果から、本発明の鉄-Lf複合体には通常のLfよりも多量の炭素原子および鉄原子が結合していることが明らかとなった。また、本実験系において、炭素原子が増えたのは、重曹から供給されているとしか考えられず、炭酸イオンまたは重炭酸イオンが鉄原子と結合していることが本試験例で示された。鉄分子に対する炭素原子の割合は0.1以上であったことから、鉄原子1に対して炭酸イオンまたは重炭酸イオンが0.1分子以上の割合で結合していることがわかる。また、試験例3において鉄1分子に対して重炭酸イオンが1分子結合していることが考えられたので、製造条件より鉄、炭素原子の結合割合は変化していると思われる。いずれにしても、本試験例から、炭酸および/または重炭酸イオン、および鉄イオンが鉄-Lf複合体に結合していることは明らかである。なお、試料3では鉄原子は検出されず、透析により遊離の鉄はほとんどすべて除去されていることを確認した。

## 【0025】

【試験例5】特開平7-17875号公報ではLf溶液に鉄塩を添加した後、アルカリを加えてpHを上げ、次いでその溶液から遊離の鉄を除去した後、溶液を蒸発させ、Lf粉末として取り出すことからなるLf 1グラム当たり2.1グラム以上の鉄を安定な状態で保持する鉄/Lf粉 ※

※末の製造方法について開示されている。また、特開平4-141067号公報ではLf 1グラムに対して少なくとも1.5ミリグラム以上の割合の鉄に相当する鉄化合物を添加し、Lfと鉄を反応させて鉄/Lf溶液を調製する製造方法について開示されている。本試験例ではこれらの鉄/Lf溶液と本発明の鉄-Lf複合体との構造上の違いについて試験例で示す。

【0026】使用したLfは試験例4で示したとおりに脱鉄したものを使用した。本発明の鉄-Lf複合体は実施例4の試料1と同様に調製し、試料1とした。特開平7-17875号公報の鉄/Lf溶液はLf 2.5マイクロモルを含む溶液20ミリリットルに塩化第二鉄を100マイクロモル添加した。さらに、この溶液に1モルの水酸化ナトリウム水溶液を微量ずつゆっくり滴下し、pHが9になるまで調製し、試料2とした。特開平4-141067号公報の鉄/Lf溶液はLf 2.5マイクロモルを含む溶液20ミリリットルに鉄として硫酸第一鉄七水和物を300マイクロモル添加して作製し、試料3とした。さらに対照として脱鉄したLfを同じく実施例4の方法で調製し、試料4とした。得られた4つの試料は試験例4と同様に脱塩、凍結乾燥、真空乾燥したのち、鉄原子を原子吸光分析機により、窒素、炭素および水素原子をCHN元素分析機により分析した。

## 【0027】

## 【表7】

試料	$\Delta C^{1)}$ (モル)	$\Delta H^{2)}$ (モル)	$\Delta N^{3)}$ (モル)	$Fe^{4)}$ (モル)
----	-------------------------	-------------------------	-------------------------	-------------------

15

16

1	60	303	0	117
2	3	23	0	19
3	-10	-8	1	20

<sup>1)</sup> (試料 1 モルあたりの総炭素原子モル数) - (L f (試料 4) 1 モルあたりの総炭素原子モル数)

<sup>2)</sup> (試料 1 モルあたりの総水素原子モル数) - (L f (試料 4) 1 モルあたりの総水素原子モル数)

<sup>3)</sup> (試料 1 モルあたりの総窒素原子モル数) - (L f (試料 4) 1 モルあたりの総窒素原子モル数)

<sup>4)</sup> (試料 1 モルあたりの総鉄原子モル数)

【0028】以上の結果から、本発明の鉄-L f 複合体 (試料 1) は、通常の L f と比較して炭素原子、水素原子、および鉄原子が通常の L f よりも極めて多量に結合していることがわかる。このことから、本発明の鉄-L f 複合体は通常の L f とは異なる構造体を形成していることが明らかである。一方、特開平 7-17875 号公報に開示された鉄/L f 溶液 (試料 2) では水素原子で結合水等の影響が出るため、ややばらつきが認められるものの、炭素原子、水素原子、窒素原子ともに通常の L f と同じであり、鉄原子のみが増加していることから、本発明の鉄-L f 複合体とは異なる状態で鉄が存在していることがわかる。さらに、特開平 4-141067 号公報の鉄/L f 溶液も同様に、炭素原子、水素原子、窒素原子ともに通常の L f と同じであり、鉄原子のみが若干増加していることがわかる。以上のことから、構造上、本発明の鉄-L f 複合体は特開平 7-17875 号公報および特開平 4-141067 号公報の鉄/L f 溶液とは全く構造上違うものであることが明らかである。

【0029】一般に L f、鉄および重炭酸塩を混合すると鉄飽和型 L f が生成することは、従来から知られている。L f は N ロープと呼ばれる領域と C ロープと呼ばれる類似した領域との二つの領域で構成されている。鉄はこの二つの領域のそれぞれに 1 分子ずつ結合する。すなわち、N ロープでは、Asp60, Tyr192, Tyr192, His253 の 4 個のアミノ酸残基に 1 分子の鉄イオンが結合し、さらにこの鉄に  $\text{CO}_3^{2-}$  が 1 個結合している。C ロープにおける同様な鉄結合部位は Asp395, Tyr435, Tyr528, His597 である (B.F. Anderson et al., J. Mol. Biol. 209:711-734, 1989)。したがって、通常鉄飽和型 L f というのは、L f 1 モル当たり鉄が 2 モル、 $\text{CO}_3^{2-}$  が 2 モル結合している。また、鉄飽和型 L f は鉄の結合していない L f に比べると若干安定性が増すが、65℃以上で加熱すると沈殿してしまう。ところが本発明による鉄-L f 複合体は鉄の結合量、炭酸および/または重炭酸の結合量がいわゆる鉄飽和型 L f よりはるかに多い。

【0030】また、特開平 4-141067 号公報において、L f に多量の鉄を添加すると鉄が L f に結合し非遊離状態となり、鉄が安定化されることが示されているが、鉄を

多量に添加することによって L f に耐熱性が付与されることは何ら示されていない。また、同公報では炭酸イオンまたは重炭酸イオンの必要性や炭酸・炭酸塩・重炭酸塩を用いるということも何ら示されておらず、全ての実施例においても炭酸・炭酸塩・重炭酸塩が使用されていない。さらに、試験例 5 から鉄原子、炭素原子、水素原子数が本発明の鉄-L f 複合体と明らかに異っている。したがって本発明による鉄-L f 複合体とは全く異なる。

【0031】本発明の鉄-L f 複合体は、炭酸および/または重炭酸の結合量、および鉄結合量がいわゆる鉄を 2 分子結合した通常鉄飽和型 L f より遥に多い。炭酸および/または重炭酸、および鉄が L f の高次構造 (3 次、4 次) 変化を起こしたり、炭酸および/または重炭酸、および鉄が L f の周囲を取り囲んでいたりするものと考えられる。実際、通常鉄飽和 L f を認識する抗 L f 抗体による本発明の鉄-L f 複合体の認識の程度は炭酸および/または重炭酸と鉄が L f に結合するに従って、低くなっていく。その様子を次に示す。

#### 【0032】

【試験例 6】L f は、L f 溶液を 0.1% エチレンジアミン 4 酢酸を含むクエン酸緩衝液に対して透析し、脱鉄した後、水に対して透析して凍結乾燥したものをを用いた。1 モル/リットルの重炭酸ナトリウムを含む pH 8.3 の溶液 1 リットル (A 溶液)、塩化第二鉄を鉄イオンとして 0 から 480 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル (B 1 溶液)、L f 1 ミリモルを含む溶液 0.8 リットル (B 2 溶液) を調製した。B 1 溶液と B 2 溶液を混合後、1 ~ 100 倍に脱イオン水で希釈した (B 溶液)。A 溶液に B 溶液 1 リットルを加え、鉄を結合した L f を調製した。この溶液を模擬緩衝液で倍々に希釈した。一方、ELISA 用プレートに抗ウシ L f 抗体をコートした後に、ブロックエース (大日本製薬 (株) 販売) でブロッキングした。先に調製した L f 溶液を添加し、室温にて 1 時間反応させた後、パーオキシダーゼを標識した抗ウシ L f 抗体を反応させた。よく洗浄した後に ABTS 基質を加え、405nm の吸光度を測定した。このように、鉄が L f に対して 2 分子結合しているときは、鉄がない場合と同様に認識されるのに対して、鉄量が増えるにしたがって、抗体で認識されなくなった。その結果を表 8 に示す。なお、表の認識率とは、鉄を結合した L f の溶液に含有される L f 量に対する、本測定法で定量される L f 量の比率をいう。

#### 【0033】

#### 【表 8】

鉄 (モル/モル L f)	抗体での認識率 (%)
0	1 0 0
2	1 0 0
1 5	9 0
3 0	8 6
6 0	8 2
9 0	6 0
1 2 0	3 1
1 5 0	1 9
2 4 0	1 4
4 8 0	1 4

【0034】さらに本発明の鉄-L f 複合体は、特開平6-239900号あるいは特開平4-141067号の鉄/L f とpH安定性の面でも異なっている。このことを次の試験例で示す。

【試験例7】本発明の鉄-L f 複合体の作製は試験例6と同様に行った。特開平6-239900号の鉄-L f 結合体は、L f 33.75マイクロモル/リットルの水溶液に塩化第2鉄を鉄として 0.5~16.2ミリモル/リットルとなるよう添加し、重炭酸ナトリウムでpHを 6.2に調整して作製した。特開平4-141067号の鉄/L f 溶液は、12.5マイクロモル/デシリットルとなるようL f を溶解した水溶液に硫酸第1鉄7水和物を鉄として 187~6000マイクロモル/デシリットル溶解して作製した。この際、炭酸イ \*

\* オンおよび/または重炭酸イオンを発生する炭酸・炭酸塩・重炭酸塩などは使用していない。このように3つの方法で作製した各試料を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮し、模擬緩衝液 (pH 6.4あるいは 7.2) にて、L f として125 マイクロモル/リットルとなるよう希釈した。pHを 6.5と 7.3にそれぞれ調整し、ネジロ付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、3,000rpm、10分間遠心分離し、上清中のL f 含量を測定した。なお、この測定にはBioRad社製 Protein Assay Kitを使用した。上清に残存しているL f の割合を表9に示す。

【0035】

【表9】

Fe/Lfモル比	特開平4-141067		特開平6-239900		本発明	
	pH6.5	pH7.3	pH6.5	pH7.3	pH6.5	pH7.3
15	5%	6%	80%	43%	100%	100%
30	7	6	84	40	100	100
60	4	3	97	54	100	100
120	6	1	98	38	100	100
150	5	4	81	27	100	100
240	9	2	79	21	100	100
480	2	6	80	13	98	89

【0036】このように、本発明ではpH 6.5あるいは 7.3のいずれにおいても耐熱性を示したが、特開平6-239900号ではpH 6.5では耐熱性を示したものの、pH 7.3では耐熱性を示さなかった。また、特開平4-141067号ではpH 6.5および 7.3のいずれにおいても耐熱性を示さなかった。

【0037】

【試験例8】塩濃度の低い領域では、通常のL f でも耐熱性があることが知られている (特開平4-8269号)。以下に、本発明の鉄-L f 複合体のみが塩濃度の高い領域

で耐熱性があることを示す。本発明の鉄-L f 複合体の作製は、試験例6と同様に行った。特開平6-239900号の鉄-L f 結合体および、特開平4-141067号の鉄/L f 溶液の作製は試験例7と同様に行った。また、特開平7-17875号の鉄/L f 溶液は、AおよびB法の2通りについて作製した。A法では12.5マイクロモル/デシリットルとなるようL f を溶かした水溶液に、塩化第二鉄を鉄として 0.5~16.2ミリモル/リットルとなるように添加し、さらに1N水酸化ナトリウムでpHを 9.0に調整して作製した。B法では12.5マイクロモル/デシリットルとな

るようにLfを溶かした50ミリモル／リットル シュウ酸アンモニウム溶液 (pH8.0)に溶解し、塩化第二鉄を0.5～16.2ミリモル／リットルとなるように添加し、1N水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し作製した。このように5つの方法で作製した各試料を分子量分画10,000カットの限外濾過膜 (アドバンテック社) にて脱塩、濃縮し、Lfとして250マイクロモル／リットルとなるように超純水で希釈した。この時の電気伝導度は0.2ミリジーメンズ／センチメートルであった。さらに模擬緩衝液\*

\* (pH7.0)で4倍に希釈し、さらに塩濃度を上げるために30ミリモル／リットルになるように食塩をそれぞれ添加した。ネジ口付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、Lfの沈澱生成を観察した。沈澱の認められないものを0、沈澱のやや認められるものを1、沈澱の多いもの、および鉄／Lf溶液作成中にすでに沈澱を生じたものを2とした。

【0038】

【表10】

Fe/Lf比	特開平4-141067	特開平7-17875		特開平6-239900	本発明
		A法	B法		
30	2	2	2	0	0
60	2	2	2	0	0
120	2	2	2	0	0
150	2	2	2	1	0
240	2	2	2	2	0

【0039】Lfはイオン強度が低い場合、耐熱性があることが既に開示されている (特開平4-8269号)。このなかで、Lf水溶液又は鉄結合型Lfの加熱殺菌が可能な電気伝導度範囲を以下の式によって開示している。

$\text{Log } \Omega \leq 2.96/\text{pH} + 0.64$  (pH<5) ①

$\text{Log } \Omega \leq 29.37/\text{pH} - 4.62$  (5≤pH≤7.9) ②

$\text{Log } \Omega \leq -0.917$  (pH>7.9) ③

ただし、Ωは電気伝導度 (ミリジーメンズ／センチメートル) を示す。例えば、本試験例で脱塩後のpHは約7.0であったので、pH7.0における通常のLfの加熱殺菌可能な電気伝導度範囲を計算すると、以下の通りになる。

②式より

$\text{Log } \Omega \leq 29.37/7 - 4.62$

≤-0.42

これより

$\Omega \leq 10^{-4.42}$

≤0.38

④

【0040】すなわち、電気伝導度0.38ミリジーメンズ／センチメートル以下であれば、殺菌することが可能であることが既に明らかとなっている。従って、通常の脱塩処理によって、Lfは加熱殺菌が可能となる。各試料は異なる調製法であるため、一度全て脱塩し、再度食塩にて塩濃度を上げて同一条件で、その耐熱性試験を行った。今回行った脱塩処理では0.2ミリジーメンズ／センチメートルまで脱塩し、0.03モル／リットルの食塩を添加し、耐熱性試験を行ったものである。この時の電気伝導度は0.53ミリジーメンズ／センチメートルであった。この値は④よりも高い値であり、通常のLfでは耐熱性が認められない領域である。表10から、本発明の鉄-

※Lf複合体においては沈澱が認められず、熱に対して通常のLfとは異なる高い熱安定性をもつことを示した。また、特開平6-239900号でも通常のLfと異なる高い熱安定性を示したが、Fe/Lf比が高いところでは不安定になった。特開平4-141067号および、特開平7-17875号ではいずれも沈澱したことから、通常のLfと同程度の耐熱性しかもたないことが示された。このことから、本発明の鉄-Lf複合体は通常のLfおよび他の開示された鉄/Lf溶液とは異なる構造をとって高い耐熱性を示していることがわかる。

【0041】また、本発明の組成物のより高い電気伝導度における耐熱性については試験例9に示す。

【試験例9】試験例6と同様にして鉄-Lf複合体を調製した。ただし、B1液の鉄含量は1000ミリモルまでとした。この溶液を分子量5000カットの限外濾過膜で脱塩・濃縮した後、模擬緩衝液でLf含量として625マイクロモル／リットルとなるよう希釈した。この場合の模擬緩衝液は、pH2.0～3.5はグリシン塩酸、pH3.5～6.0は酢酸、pH6.0～7.8はイミダゾール塩酸、pH7.8～9.3はホウ酸一塩化カリウム水酸化ナトリウムを緩衝剤とした。また、電気伝導度の調整は塩化ナトリウムを用いた。これをネジ口付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、3,000rpm、10分間遠心分離、上清中のLf含量を測定した。なお、この測定にはBioRad社製Protein Assay Kitを使用した。上清に残存しているLfの割合を表11及び表12に示す。

【0042】

【表11】

電気伝導度が5ミリジーメンズ／センチメートルの場合

21 モル 比	22										
	2.0	2.1	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.8	9.0	9.2
10	59	58	57	52	50	46	33	38	31	32	34(%)
15	50	73	74	72	71	75	76	80	77	72	45
30	46	82	91	95	96	97	99	100	100	100	36
60	51	95	93	97	98	100	100	100	100	100	43
120	54	97	100	100	100	100	100	100	100	100	39
240	32	99	100	100	100	100	100	99	99	97	40
480	21	92	93	96	100	100	100	98	96	93	47
1000	20	76	77	78	79	78	95	94	92	92	39
1200	19	32	28	31	33	27	29	30	24	33	32

【0043】

\* \* 【表12】

電気伝導度が 150ミリジーメンズ/センチメートルの場合

Fe/Lf モル 比	pH										
	2.0	2.1	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.8	9.0	9.2
10	51	50	52	53	49	46	37	34	31	32	31(%)
15	44	70	71	72	70	73	72	73	72	64	40
30	41	73	82	85	85	85	87	88	89	87	34
60	45	84	82	84	85	87	89	88	90	89	36
120	47	87	89	90	90	90	90	92	91	88	34
240	28	88	89	90	90	90	90	89	90	87	35
480	20	79	82	83	81	83	86	85	82	80	41
1000	18	66	68	68	70	69	84	83	80	79	34
1200	19	26	26	28	30	27	26	27	25	29	26

【0044】このようにLf 1分子に対して、鉄が15分子以上1000分子以下でないと耐熱性が得られず、この範囲内であれば、pH2.1 から9.0 の範囲で耐熱性が確認された。さらに言えば、Lf 1分子に対して、鉄が15分子よりも30分子のほうが耐熱性が高く、30分子よりも60分子、60分子よりも120分子のほうがさらに耐熱性が高い。また、Lf 1分子に対して、鉄が1000分子よりも480分子、480分子よりも240分子のほうが耐熱性が高い。Lf 1分子に対して、鉄が1000分子結合している場合は、pH5以下よりpH5を超える場合のほうが耐熱性が高い。特開平6-239900号の方法にて製造された鉄-Lf 結合体は鉄が720分子以上Lf に結合することができず沈澱するが、本発明では1000分子の鉄を結合することができるので、この点からも本発明の鉄-Lf 複合体と特開平6-239900号の方法にて製造された鉄-Lf 結合体は異なっているといえる。特開平4-8269号ではLf の配合された飲料を殺菌する場合、製品の最終pHは電気伝導度 $\Omega$ の関係が、 $\log \Omega$  (ミリジーメンズ/センチメートル) > (2.96/pH) + 0.64 (pH<5)

 $\log \Omega > (29.37/\text{pH}) - 4.62 \quad (5 \leq \text{pH} \leq 7.9)$ 
 $\log \Omega > -0.917 \quad (\text{pH} > 7.9)$ 

であるような場合でないと沈澱を生じたり、Lf が鉄を結合できなくなるような変性を受けるとしている。

【0045】本発明によって得られた鉄-Lf 複合体を配合した製品を製造する場合、150ミリジーメンズ/センチメートルであって、pHが2.1 から9.0 の範囲であっても耐熱性を有する極めて安定な鉄-Lf 複合体であるため、 $\Omega$ とpHの関係が上に記した関係以外の場合であっても製造上、全く問題を生じない。

【0046】次に、本発明と特開平6-239900号、特開平7-17875号及び特開平4-141067号との保存安定性の違いを示す。

【試験例10】試験例7、試験例8および試験例9と同様に鉄-Lf 複合体、鉄-Lf 結合体および鉄/Lf 溶液を作製し、試験例9と同様に脱塩して5ミリジーメンズとなるよう電気伝導度を調整した。遠心処理した各試料を密封して90℃、10分間加熱した後、室温(37℃)で一ヵ月保存した。その後の沈澱量を目視にて判定した。

50 沈澱の認められないものを0、沈澱がやや認められるも

のを 1、沈澱が多いものを 2 とした。なお、特開平 7-17  
875 号については、保存期間 3 週間で行った。試験例 7  
の鉄-Lf 結合体および鉄/Lf 溶液の結果を表 1 3  
に、試験例 9 の鉄-Lf 複合体の結果を表 1 4 に、それ\*

\* ぞれ示す。  
【0 0 4 7】  
【表 1 3】

Fe/Lf モル比	特開平 4-141067		特願平 6-239900		特開平 7-17875				本発明	
	pH 6.5	pH 7.3	pH 6.5	pH 7.3	A 法 pH 6.5 pH 7.3		B 法 pH 6.5 pH 7.3		pH 6.5	pH 7.3
30	2	2	0	1	2	2	2	2	0	0
60	2	2	0	2	2	2	2	2	0	0
120	2	2	0	2	2	2	2	2	0	0
150	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
240	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0
480	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0

【0 0 4 8】

※20※ 【表 1 4】

Fe/Lf モル 比	p H											
	2.0	2.1	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.8	9.0	9.2	
10	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	
15	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
30	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
60	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
120	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
240	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
480	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	
1000	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	2	
1200	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	

【0 0 4 9】表 1 3 および 1 4 から、本発明の鉄-Lf 複合体は pH 2.1 から 9.0 の範囲において、90℃、10 分の熱ストレスを与えた後であっても、常温で高い保存安定性を有していた。表 1 3 から本発明の鉄-Lf 複合体は、他の特許に開示された Lf にはない保存安定性があることがわかる。特開平 6-239900 号では pH 6.5 では Fe/Lf モル比が 150 以下であれば安定であるが、pH 7.3 では保存安定性がないことがわかる。また、特開平 4-141067 号の Lf 溶液は pH 6.5 および 7.3 において、すでに耐熱性がないため、当然のことながら保存安定性を欠いていた。また、特開平 7-17875 号においても、A および B 法ともに保存安定性は認められなかった。

【0 0 5 0】本発明によって得られた Lf を配合した製品を製造する場合、その製造工程については特に制限はない。殺菌は、通常実施されている工程に従い処理し、

加熱殺菌あるいは滅菌する。加熱処理は 65℃、30 分間の低温殺菌、120℃、2～3 秒間、140～150℃、3～5 秒間、あるいはレトルト処理も可能である。また、乾燥すれば Lf 含有粉末製品を得ることが出来る。凍結乾燥でもよいが、大量に処理する場合には乾燥コストの安い噴霧乾燥が適している。再溶解させることを目的とした場合には、脱脂乳、乳清、カゼイン、ゼラチン、ショ糖、澱粉などに混合すると溶解性が向上する。このようにして得られた Lf 含有製品は鉄が含まれているので、貧血予防あるいは治療を目的とした食品、飼料、医薬品に特に適している。特に、鉄の収斂性を完全に抑えるので、鉄強化食品や経口投与の医薬品への鉄材として優れている。さらに鉄の過酸化物生成促進作用を防止する性質もあるため、脂肪など酸化され易い食品などへの鉄材として利用価値が高い。



## 【0051】

【試験例11】試験例7と同様にして鉄-Lf複合体、鉄-Lf結合体および鉄/Lf溶液を調製した。但し、Lfの終濃度は13.2マイクロモル/リットルとし、添加した鉄剤の終濃度は鉄量として1.98ミリモル/リットルとなるよう調製した。なお、鉄剤としては、本発明の鉄-Lf複合体及び特開平6-239900号の鉄-Lf結合体では塩化第二鉄を使用し、特開平4-141067号のLf溶液では硫酸第一鉄を使用した。また、対照として、1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄水溶液、1.98ミリモル/リットル硫酸第一鉄水溶液、1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄を含む13.2マイクロモル/リットルLf水溶液を調製した。試料番号7は、1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄及び13.2マイクロモル/リットルLfを重炭酸ナトリウム水溶液に同時に添加したものであり、本発明の製造法に従わずに製造した試料である。得られた各試料は、分子量10000 カットのモルカット（ミリオア社）に1ミリリットル添加し、脱塩した。それぞれの試料について、リテンテート量が0.2 ミリリットルになったところで1ミリリットル加水し、総計6ミリリットル加水した。得られたリテンテート及びパーミエートについて \*

\*は、原子吸光分析機（ICP）により鉄含量を測定した。なお、示したモル濃度は全て終濃度で示した。また、リテンテート鉄残存率は次式より求めた。

$$\text{リテンテート鉄残存率 (\%)} = \left\{ \frac{\text{リテンテート鉄総量}}{\text{リテンテート鉄総量} + \text{パーミエート鉄総量}} \right\} \times 100$$

【0052】さらに、鉄の収斂味については、調製した試料を限外濾過膜で処理する前に試験した。結果を表15に示す。

試料1：本発明の鉄-Lf複合体

試料2：特開平6-239900号の鉄-Lf結合体

試料3：1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄含有13.2マイクロモル/リットルLf水溶液

試料4：特開平4-141067号のLf溶液

試料5：1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄水溶液

試料6：1.98ミリモル/リットル硫酸第一鉄水溶液

試料7：1.98ミリモル/リットル塩化第二鉄及び13.2マイクロモル/リットルLf含有重炭酸ナトリウム水溶液

## 【0053】

【表15】

試料番号	リテンテート鉄残存率(%)	収斂味
1	99.3	なし
2	98.1	なし
3	25.3	あり
4	10.9	あり
5	6.2	あり
6	3.9	あり
7	23.2	あり

【0054】試料5及び試料6において全ての鉄はパーミエートに移行しており、水溶液中で使用した鉄剤が分子量10000 カットの膜を透過したことが判った。一方、試料1及び試料2では全ての鉄がリテンテートに残存しており、鉄がLfと結合し、分子量10000 カットの膜を透過しなかったことが判った。また、試料3は鉄及びLf混合物を重炭酸ナトリウム水溶液に添加する前の状態を示すものであるが、多くの鉄が遊離状態で存在し、鉄はパーミエートに移行している。さらに、試料7においては、単に塩化第二鉄、Lf及び重炭酸ナトリウムを同時に接触させるだけでは遊離の鉄が多量に存在することを示している。

【0055】以上の結果から、本発明の鉄-Lf複合体を調製するに際しては、重炭酸ナトリウム水溶液が必要であり、かつ、その調製手順も重要であることが改めて確認された。なお、試料4においては、鉄は殆どパーミエートに移行しており、遊離の状態であることが判った。鉄の収斂味（鉄味）については、試料1及び試料2

では認められなかったが、他の試料では認められた。

【0056】つぎに呈味性の成績を示す。

【試験例12】試験例7と同様に、3つの方法で作成した各種鉄/Lf混合溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮し、模擬緩衝液（pH 6.8）にて鉄イオンとして13 ミリグラム/100ミリリットルおよび26ミリグラム/100ミリリットルとなるよう蒸留水で希釈した。このようにして得られた試料について、以下のような官能評価試験を行った。男5女5名のパネラーに模擬緩衝液を対照として各試料の収斂味を感じるかどうかを判定させた。パネラーには目隠しをし、外見による判断要因を与えないよう配慮した。一試料のための試験は、対照、試料の順に試飲させ、一試料評価後、最低一日の間隔をあけて、次の試料を評価するための試験を実施した。また、試料評価の日間偏差をなくすため、各パネラー毎に試料評価の順番をランダム化した。その結果、パネラー10人のうちで収斂味を感じた人数を表16に示す。

【0057】

\* \* 【表16】

Fe/Lfモル比	特開平4-141067		特開平6-239900		本発明	
	鉄濃度（ミリグラム/100ミリリットル）					
	13	26	13	26	13	26
15	10人	10人	0人	0人	0人	0人
30	10	10	0	0	0	0
60	10	10	0	0	0	0
150	10	10	0	3	0	0
240	10	10	1	4	0	0
480	10	10	1	6	0	0

【0058】 以上のように、本発明は鉄の収斂味を全く感じさせない優れたマスキング効果を有することが明らかとなった。また、特開平6-239900号では鉄濃度が26ミリグラム/100ミリリットルであってFe/Lfモル比が150を超える場合に収斂味を感じるパネラーが認められ、特開平4-141067号では全ての場合においてパネラー10人全

【0059】

※【試験例13】 試験例9と同様に鉄-Lf複合体を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮し、模擬緩衝液にて、鉄イオンとして26ミリグラム/100ミリリットルとなるよう希釈し、90℃10分間の殺菌を施した。このようにして得た試料を試験例12と同様の方法にて官能評価試験した。

【0060】

※ 【表17】

Fe/Lf モル 比	pH											
	2.0	2.1	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.8	9.0	9.2	
10	10	9	8	8	7	6	6	5	6	8	10	
15	10	3	2	2	1	0	0	0	0	1	10	
30	10	1	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
60	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
120	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
240	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	
480	10	2	1	1	1	1	0	0	0	0	10	
1000	10	3	2	2	2	1	0	0	0	0	10	

【0061】 以上のように、本発明の鉄-Lf複合体は、Lf1分子に対して鉄が15分子以上1000分子以下結合したものであれば、それを取り巻く環境がpH2.1からpH9.0の範囲であれば、鉄の収斂味を抑制する効果を持っていた。この時、Lf1分子に対して鉄が480分子以上結合し、pH2.1からpH5.0の範囲で若干の収斂味を数名が感じたが、鉄含量を13ミリグラム/100ミリリットルとすると10名のパネラーの内、収斂味を感じたものはいなかった。

【0062】

【実施例1】 重炭酸ナトリウム1.2モルとLf (DMV社製) 10マイクロモルを含む溶液1リットル (A)。硫酸第二鉄を鉄イオンとして1.5ミリモルを含む溶液1リットル (B) を作成した。AにBを加え、鉄を結合し

たLfを作成した。この試料を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮し、模擬緩衝液 (pH8.9) にて、鉄濃度が26ミリグラム/100ミリリットルとなるよう希釈した。これをネジロ付き試験管に密封した後、90℃10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、室温にて1か月保存した。沈澱を肉眼にて判定したところ、全く認められなかった。さらに試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは一名も認められなかった。

【0063】

【実施例2】 炭酸カルシウム0.05モル、重炭酸アンモニウム1.2モルを含む溶液1リットルを塩酸にてpH7.8に調製した (A溶液)。硫酸第二鉄を鉄イオンとして1.5ミリモルを含む溶液0.2リットル (B1溶液)、トラン

スフェリン（アポ型、高純度、牛血漿製、和光純薬工業）10マイクロモルを含む溶液 0.8リットル（B 2 溶液）を作成した。B 1 溶液と B 2 溶液を混合後、A 溶液に B 1 / B 2 混合液を加え、鉄を結合したトランスフェリンを形成させた。鉄-トランスフェリン結合溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮し、模擬緩衝液（pH 6.8）にて、鉄濃度が26ミリグラム/200ミリリットルとなるよう希釈した。これをネジ口付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、37℃にて1か月保存した。沈澱を肉眼にて判定したところ、全く認められなかった。さらに試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0064】

【実施例3】炭酸ナトリウム 0.5モル、重炭酸カリウム 0.7モルを含む溶液 1 リットルを酢酸にて pH 8.3 に調製した（A 溶液）。硝酸鉄（III）を鉄イオンとして 1.5 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル（B 1 溶液）、オボトランスフェリン（タイプ I V、粗、卵白製、無鉄、シグマ社）10マイクロモルを含む溶液 0.8 リットル（B 2 溶液）を作成した。B 1 溶液と B 2 溶液を混合後、A 溶液に B 1 / B 2 混合液を加え、鉄を結合したオボトランスフェリンを作成した。鉄-オボトランスフェリン結合溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて脱塩・濃縮した。これを模擬緩衝液（pH 6.2）にて、鉄濃度が26ミリグラム/200ミリリットルとなるよう希釈した。これをネジ口付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、37℃にて1か月保存した。沈澱を肉眼にて判定したところ、全く認められなかった。さらに試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0065】

【実施例4】重炭酸ナトリウム1.0 モルを含む溶液 1 リットルを作製した（A 溶液）。塩化第二鉄を鉄イオンとして 1 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル（B1 溶液）、ウシラクトフェリン（ULN社製）10マイクロモルを含む 0.8 リットル（B2 溶液）を作製した。B1 と B2 を混合後、A 溶液に B1/B2 混合液を加えた。溶液の pH を 8.5 に維持するために、適時重炭酸ナトリウムを添加し、鉄-L f 複合体を作製した。得られた、鉄-L f 複合体を脱塩を行わずに 90℃10分間加熱し、室温まで自然冷却した。この状態で沈澱は認められなかった。さらに、37℃で一ヵ月間保存し、再び、沈澱を肉眼で判定したところ、全く認められなかった。さらに、試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0066】

【実施例5】重炭酸ナトリウム0.8 モルを含む溶液 1 リ

ットルを作製した（A 溶液）。硫酸第二鉄を鉄イオンとして 1 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル（B1 溶液）、ウシラクトフェリン（ULN社製）10マイクロモルを含む 0.8 リットル（B2 溶液）を作製した。B1 と B2 を混合後、A 溶液に B1/B2 混合液を加え、鉄-L f 複合体を作製した。得られた鉄-L f 複合体を脱塩を行わずに 90℃10分間加熱し、室温まで自然冷却した。この状態で沈澱は認められなかった。さらに、37℃で一ヵ月間保存し、再び、沈澱を肉眼で判定したところ、全く認められなかった。さらに、試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0067】

【実施例6】炭酸ナトリウム1.0 モルを含む溶液 1 リットルに2N塩酸で pH を 8.0 まで下げて A 溶液を作製した。硫酸第二鉄を鉄イオンとして 1 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル（B1 溶液）、ウシラクトフェリン（ULN社製）10マイクロモルを含む 0.8 リットル（B2 溶液）を作製した。B1 と B2 を混合後、A 溶液に B1/B2 混合液を加え、鉄-L f 複合体を作製した。得られた、鉄-L f 複合体を脱塩を行わずに 90℃10分間加熱し、室温まで自然冷却した。この状態で沈澱は認められなかった。さらに、37℃で一ヵ月間保存し、再び、沈澱を肉眼で判定したところ、全く認められなかった。さらに、試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうちで収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0068】

【実施例7】重炭酸ナトリウムを24モル含む溶液 8 リットル（溶けきらない塩が沈澱している）を調製した（A 溶液）。塩化第二鉄を鉄イオンとして 20 ミリモルを含む溶液 2 リットル（B 1 溶液）、ラクトフェリン（タツアバイオロジックス社製）100マイクロモルを含む溶液 8 リットル（B 2 溶液）を作成した。B 1 溶液と B 2 溶液を混合後、A 溶液を良く攪拌しながら、A 溶液に B 1 / B 2 混合液を加え、鉄を結合したラクトフェリンを形成した。この溶液を分子量5000カットの限外濾過膜にて加水脱塩後、同様の膜で 1 リットルにまで濃縮した。これを 20 リットルの還元脱脂乳（脱脂粉乳 100 グラムを水 1 リットルの比率で還元）に、鉄濃度が 26 ミリグラム/200 ミリリットルとなるよう添加した。これを攪拌混合後、プレート型殺菌機を用いて 120℃にて 2 秒間殺菌し直ちに 5℃に冷却した後、低温（10℃）にて 2 週間保存した。一部を 3,000rpm、10分間遠心分離し沈澱を肉眼にて判定したところ、全く認められなかった。さらに試験例 10 と同様の方法にて官能評価試験を実施した。ただし、対照は還元脱脂乳を同様の条件にて殺菌・保存したものをを用いた。パネラー10名のうちで収斂味や味・香りなどに異常を感じたものは1名も認められなかった。

## 【0069】

【実施例 8】実施例 4 で作製・濃縮・脱塩した鉄／L f 混合溶液を 20 リットルの生乳に、鉄濃度が 26 ミリグラム / 200 ミリリットルとなるよう添加した。これを均質化した後に 150℃ 4 秒間滅菌し直ちに 4℃ に冷却し 250 ミリリットルずつ紙容器に無菌的に充填した。37℃ にて 3 ヶ月保存後、遠心分離し沈澱物の有無を調べたが、沈澱は全く認められなかった。また、大腸菌数および一般細菌数共に 0 であった。また、鉄が存在しているために保存中に褐変が進行する恐れがあったが、全く褐変は認められなかった。さらに試験例 12 と同様の方法にて官能評価試験を実施した。ただし、対照は生乳を同様の条件にて殺菌・保存したものをを用いた。パネラー 10 名のうちで収斂味や味・香りなどに異常を感じたものは 1 名も認められなかった。

【0070】

【実施例 9】実施例 4 で作製・濃縮・脱塩した鉄／L f 複合体溶液（試験群）または硫酸第一鉄溶液（対照群 1）を、鉄濃度が 20 ミリグラム / 100 ミリリットルとなる \*

ヘモグロビン値 （平均値±標準偏差）

試験群	15.2±1.1	（グラム/100ミリリットル）
対照群 1	12.9±0.9	
対照群 2	4.8±0.3	

【0072】以上のように、本発明の鉄－L f 複合体は貧血治療効果を示し、さらに、その効果は無機鉄である硫酸第一鉄よりも優れていたことが明らかとなった。

【0073】

【実施例 10】実施例 4 で作製・濃縮・脱塩した鉄－L f 複合体溶液を、アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムをビタミン C として 30 ミリグラム / 200 ミリリットル添加した生乳に、鉄濃度が 15 ミリグラム / 200 ミリリットルとなるよう添加し、約 200 ミリリットル容量の耐熱ガラス瓶にヘッドスペース 10 ミリリットル以下となるよう充填した（試験群）。対照として、鉄－L f 複合体の代わりにクエン酸鉄ナトリウムを添加したビタミン C 強化乳を用いた（対照群）。これを F 値 4 でレトルト滅菌し、37℃ で 2 週間保存し、残存するビタミン C 含量をビタミン C 測定器（TOA 電子社製）にて定量した。ビタミン C 残存率は測定値を初期値で割った百分率とした。その結果を表 19 に示す。

【0074】

【表 19】

	残存率
試験群	89%
対照群	62

【0075】以上のように、鉄－L f 複合体は無機鉄に

\* よう、アスコルビン酸およびアスコルビン酸ナトリウムをビタミン C として 6.2 ミリグラム / 100 グラム含む生理的リン酸緩衝液（pH 7.2）に溶解し、90℃、10 分間の殺菌をしたものを試験試料とした。対照群 2 として、ビタミン C を添加した生理的リン酸緩衝液を殺菌したものも作成した。離乳直後、21 日齢のウィスター系雌ラット（日本チャールスリバー）の中、体重が 45 から 50 グラムのものをを選び、除鉄食（オリエンタル酵母、鉄含量 0.25 ミリグラム / 100 グラム飼料）を 2 週間与え、血中ヘモグロビン値が 7 グラム / 100 ミリリットル以下の貧血ラットを作成した。ラットは 1 群 4 匹として、その後も除鉄食を与え続けながら、試験試料を 1 ミリリットル / 日、6 週間、強制経口（ゾンデ）投与した。試験試料投与後 6 週間目に、尾静脈より採血し、自動血球計測装置（東亜医用電子）でヘモグロビン値を測定した。その結果を表 18 に示す。

【0071】

【表 18】

比べてビタミン C の破壊の程度が低く、酸化および過酸化生成能の低い鉄材としても有効であることが明らかとなった。

【0076】さらに、試験群について試験例 12 と同様の方法にて官能評価試験を実施した。ただし、対照は鉄を添加していないビタミン C 強化乳を同様の条件にてレトルト処理したものをを用いた。パネラー 10 名のうちで収斂味などに異常を感じたものは 1 名も認められなかった。

【0077】

【実施例 11】1 グラムの L f（DMV 社製）を 0.2 モル / リットルの酢酸緩衝液（pH 4）に溶解し、ペプシン（シグマ社）26000 ユニット添加し、37℃、2 時間反応後、水酸化ナトリウムで pH 7.5 とした。これにトリプシン（シグマ社）200000 ユニートを添加して、37℃、2 時間反応させた。このようにして得た分解 L f は電気泳動により、主に分子量 50000、40000、30000 カットの分解物となっていることを確認した。重炭酸ナトリウムを 1.3 モル含む溶液 1 リットル（溶けきらない塩が沈澱している）を調製した（A 溶液）。塩化第二鉄を鉄イオンとして 1.2 ミリモルを含む溶液 0.2 リットル（B 1 溶液）、ラクトフェリン分解物を分解前のラクトフェリンとして 10 マイクロモルを含む溶液 0.8 リットル（B 2 溶液）を作成した。B 1 溶液と B 2 溶液を混合後、A 溶液を良く攪拌しながら、A 溶液に B 1 / B 2 混合液を加え、鉄を結合したラクトフェリン分解物を作成した。こ

れをネジロ付き試験管に密封した後、90℃、10分間加熱し、室温まで自然冷却した後、37℃にて1か月保存した。沈澱を肉眼にて判定したところ、全く認められな\*

\* った。さらに試験例12と同様の方法にて官能評価試験を実施したところ、パネラー10名のうち、収斂味を感じたものは1名も認められなかった。

---

フロントページの続き

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>6</sup>, D B名)

C07K 14/79

A61K 38/16